

9. Dhar-Mascreano M., Sacramo J.M. Hypoxia-reoxygenation-induced mitochondrial damage and apoptosis in human endothelial cells. *Free Radic. Biol. Med.* – 2005. – V. 38. – № 10. – P. 1548-1554.
10. Виленский Б.С. Препараты нейротрофического действия в лечении инсульта. *Качество жизни / Б.С.Виленский // Медицина. Болезни сердечно-сосудистой системы.* – 2003. – № 2. – С. 53-56.
11. Етика лікаря та права людини: положення про використання тварин у біомедичних дослідках // *Експер. та клін. фізіол. Біохімія.* – 2003. – 2003. – №2 (22). – С. 108-109.
12. Estevez A.G., Spear N., Pelluffo H., Kamaid A., Barberro L., Beckman J.S. – 1999. *Methods in Enzymology.* 301. P. 393-402.

УДК 57.043:577.11:612.014.464

ВОЗДЕЙСТВИЕ НИЗКИХ ТЕМПЕРАТУР И ОЗОНА НА ФЕРМЕНТАТИВНУЮ АКТИВНОСТЬ И СТРУКТУРУ ХОЛИНЭСТЕРАЗЫ

Белых И.А., к.б.н., доцент

Сакун А.В., к.б.н., начальник научно-исследовательской лаборатории

Национальный технический университет "Харьковский политехнический институт"

На основе анализа первых производных спектров собственной флуоресценции и активности холинэстеразы рассмотрен механизм влияния замораживания-отогревания водных растворов ХЭ на её структуру. Медленное замораживание-отогревание, вероятно, приводит к конформационным изменениям ХЭ на уровне четвертичной структуры, что сопровождается увеличением ферментативной активности. Экспериментально установлено, что воздействие озона в низких дозах на ХЭ после её медленного замораживания-отогревания не влечёт за собой изменения ферментативной активности.

Ключевые слова: холинэстераза, замораживание-отогревание, озон, флуоресценция.

Белых И.А., Сакун О.В. ВПЛИВ НИЗЬКИХ ТЕМПЕРАТУР І ОЗОНУ НА ФЕРМЕНТАТИВНУ АКТИВНІСТЬ І СТРУКТУРУ ХОЛІНЕСТЕРАЗИ / Національний технічний університет "Харківський політехнічний інститут", Україна

На основі аналізу перших похідних спектрів власної флуоресценції й активності холинестерази розглянутий механізм впливу заморожування-відігрівання водних розчинів ХЕ на її структуру. Повільне заморожування-відігрівання, вірогідно, призводить до конформаційних змін ХЕ на рівні четвертинної структури, що супроводжується збільшенням ферментативної активності. Експериментально встановлено, що вплив озону в малих дозах на ХЕ після її повільного заморожування-відігрівання не спричиняє змін ферментативної активності.

Ключові слова: холинэстераза, заморозування-відігрівання, озон, флуоресценція.

Belykh I.A., Sakun A.V. LOW TEMPERATURE AND OZONE EFFECT ON ENZYMATIC ACTIVITY AND STRUCTURE OF CHOLINE ESTERASE / National Technical University "Kharkov Polytechnical Institute", Ukraine

Basing on the analysis of first derivatives of own fluorescence spectra and activity of choline esterase (CE) the mechanism of CE aqueous solutions freeze-thawing effect on its structure is considered. Slow freeze-thawing is believed to lead to conformation changes in CE on the quaternary structure level, followed by the increase in enzymatic activity. It was experimentally found that low dose ozone effect on CE after its slow freeze-thawing cause no changes in enzymatic activity/

Key words: choline esterase, freeze-thawing, ozone, fluorescence.

ВВЕДЕНИЕ

Развитие криобиологии всегда было связано с поиском методов искусственной защиты клеток от повреждений при замораживании-отогревании. Открытие криопротекторов стало той отправной точкой, с которой началось практическое применение криогенных биотехнологий. Наряду с изучением криопротекторных методов защиты, проводились исследования способов повышения устойчивости клеток к процедуре криоконсервирования, эффект которых дополнял бы защитное действие криопротекторов и не основывался на коллигативных эффектах. Известен ряд веществ, которые, в зависимости от дозы, могут оказывать на клетки либо положительное, либо негативное действие. Например, токсичный (в больших дозах) газ NO может вырабатываться клетками и является вазодилатором [1]. Потенциально токсичный CO выделяется с билирубином при распаде гема [2, 3, 4],

а токсичный в высоких дозах H_2S , синтезируемый в организме из L-цистеина [5], может дополнять NO при поддержании нормального давления в сосудах. Эти газы, вырабатываемые в ничтожных количествах, являются необходимыми медиаторами в организме, но их избыточная и продолжительная выработка (например, при хронических воспалениях) очень вредна [6].

В последние годы интенсивно исследуется биологическое действие различных доз озона. Несмотря на то, что озон является сильным окислителем, его поведение можно сравнить с поведением описанных выше газов. Если озон продолжительное время вдыхается или вырабатывается в атеросклеротических бляшках, – он вреден [7], однако при использовании озона в низких дозах, он оказывает терапевтическое действие [6, 8, 9, 10]. Озон в низких дозах вызывает стимуляцию различных физиологических функций биологических объектов, причем эти эффекты наблюдаются на объектах различного уровня организации: на уровне целого организма [11], на тканях, на клетках теплокровных животных и человека [8, 12], на микроорганизмах [13], а также на биополимерах [14]. Совокупность приведенных данных даёт основание предполагать, что эффекты биологического действия низких доз озона могут быть использованы для повышения физиологической активности различных биологических объектов [15].

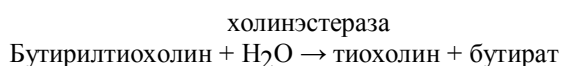
Согласно существующим представлениям, криповреждения биологических систем во многом связаны с действием холода на макромолекулы белка, в частности, на ферменты [16]. Анализ опубликованных результатов показывает, что влияние этих процессов на холинэстеразу изучено не достаточно полно, а высокая её чувствительность к воздействию различных нефизиологических факторов даёт основание использовать ХЭ как модельный объект. Учитывая то, что действие замораживания-отогревания на структуру большинства биополимеров и активность энзимов сильнее проявляется при медленном замораживании [16, 17, 18], представляет интерес исследовать влияние медленного замораживания-отогревания и замораживания-отогревания в комплексе с низкими дозами озона на холинэстеразу. Это и является целью данной работы.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследованиях применяли стандартный коммерческий препарат: лошадиную бутирилхолинэстеразу VI класса чистоты стандартной активностью 25 АЕ/мг. Озон для исследований получали из чистого кислорода на экспериментальной установке, собранной в Институте проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины. Концентрацию озона измеряли спектрофотометрическим методом на спектрофотометре SPECORD UV VIS по поглощению света на полосе Хартли (длина волны 255 нм).

Активность бутирилхолинэстеразы после замораживания-отогревания определяли по стандартной методике фотоколориметрическим методом с субстратом бутирилтиохолина йодидом [19]. Принцип методики: холинэстераза гидролизует субстрат бутирилтиохолина с образованием кислоты и тиохолина. Тиохолин взаимодействует с 5,5'-дитио-бис-(2-нитробензойной кислотой) с образованием 2-нитро-5-меркаптобензоата, окрашенного в желтый цвет.

Основная реакция:



Индикаторная реакция:



Фотоколориметрирование полученной смеси проводили при длине волны 400 нм.

Спектры флуоресценции ХЭ исследовали на спектрофлуориметре модели F – 4010 фирмы “Hitachi” (Япония) и Cary Eclipse фирмы “Varian” (США) при длинах волн возбуждения 280 и 296 нм.

Замораживание водных растворов с концентрацией ХЭ 8 мг/л объемом 10 мл проводили в герметичных пластиковых контейнерах цилиндрической формы диаметром 20 мм в два этапа. На первом этапе контейнер с исследуемым раствором выдерживали в парах азота до достижения образцом температуры

-100°C . Далее образец помещали в жидкий азот. Усреднённое значение скорости охлаждения раствора на первом этапе составляло $2^\circ\text{C}/\text{мин}$. с учётом неоднородности температурного поля внутри контейнера [20, 21, 22]. Отогрев проводили в водяной бане при температуре 40°C до достижения образцом температуры 18°C , после чего исследовали свойства ХЭ.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Определены первые производные спектров собственной флуоресценции ХЭ в водных растворах до замораживания и после замораживания-отогревания (Рис. 1). Их анализ является более информативным чем широких, плохо разрешенных спектров флуоресценции.

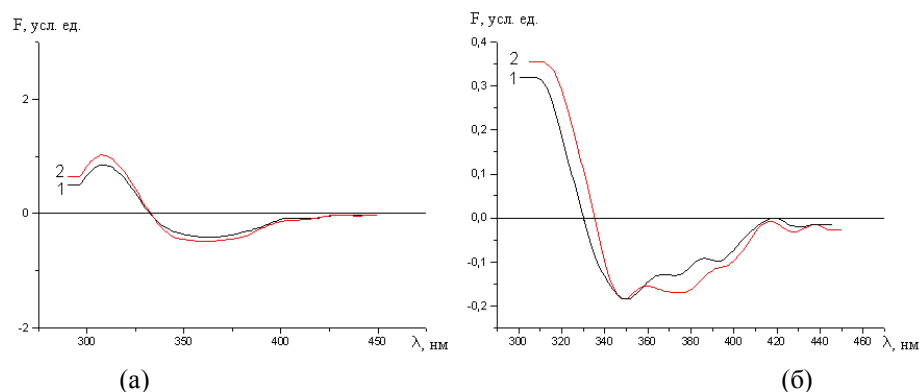


Рис. 1. Первые производные спектров флуоресценции ХЭ: а – $\lambda_{\text{возб.}} = 280$ нм; б – $\lambda_{\text{возб.}} = 296$ нм.
1 – до замораживания; 2 – после замораживания-отогревания.

Спектральные характеристики первых производных спектров флуоресценции ХЭ вместе с данными об активности ХЭ представлены в табл. 1.

Таблица 1 – Спектральные характеристики спектров собственной флуоресценции и активность холинэстеразы в водном растворе без замораживания (контроль) и после замораживания-отогревания

Длина волны возбуждения, нм	Положение максимума первой производной спектра флуоресценции, нм		Интенсивность флуоресценции, усл. ед.		Положение максимума спектра флуоресценции, нм		$\frac{\Delta E}{\text{мг}} \pm S$	
	Контроль	Медленное замораживание-отогревание	Контроль	Медленное замораживание-отогревание	Контроль	Медленное замораживание-отогревание	Контроль	Медленное замораживание-отогревание
280	330,67±1	333,0±1	25,068	30,58	330,0±1	330,0±1	23±0,3	29±0,46
296	330,54±1	335,1±1	12,10	10,10	330,0±1	335,0±1	23±0,3	29±0,46

Примечание: $\bar{c}$ – среднее арифметическое; $S_{\bar{c}}$ – среднеквадратическое отклонение.

Как видно из таблицы, медленное замораживание-отогревание не приводит к изменению положения максимума спектра флуоресценции при длине волны возбуждения 280 нм, а при длине волны возбуждения 296 нм максимум спектра флуоресценции сдвигается в длинноволновую область. Смещение первой производной спектра флуоресценции указывает на то, что спектр флуоресценции фермента определяется только триптофановыми остатками. Об этом свидетельствует и положение максимума спектра флуоресценции при указанных длинах волн возбуждения. Длинноволновый сдвиг указывает об изменении полярности микроокружения триптофановых остатков [23, 24, 25, 26] в результате действия замораживания-отогревания. Увеличение интенсивности флуоресценции при $\lambda_{\text{возб.}} = 280$ нм в этом случае может быть объяснено конформационными перестройками фермента. При $\lambda_{\text{возб.}} = 280$ нм спектр флуоресценции холинэстеразы определяется не только триптофановыми остатками, но и тирозиновыми, вклад которых в свечение хромофоров незначителен. Вероятнее всего, увеличение интенсивности флуоресценции при $\lambda_{\text{возб.}} = 280$ нм происходит за счет вклада в свечение тирозиновых остатков, возможно, активного центра, что подтверждается увеличением активности фермента под действием замораживания-отогревания [16, 18].

Таким образом, полученные экспериментальные результаты указывают на то, что замораживание-отогревание влияет на молекулярную структуру холинэстеразы, вызывая конформационные перестройки макромолекулы фермента. Известно, что замораживание-отогревание изолированных белков в растворах способно приводить к изменениям четвертичной структуры макромолекулы [27]. Полученные в данной работе результаты дают основание полагать, что медленное замораживание-отогревание фермента ХЭ приводит к конформационным изменениям макромолекулы фермента на уровне четвертичной структуры. Одновременно изменяется ферментативная активность холинэстеразы. Характер изменения спектров флуоресценции дает основание думать, что при конформационных перестройках макромолекулы фермента происходит увеличение доступа воды к хромофорам. В данном случае вода

выступает в качестве нуклеофильного агента. Известно, что с усилением нуклеофильности реактивирующая способность фермента возрастает. Следовательно, отмеченное выше увеличение ферментативной активности холинэстеразы после замораживания может быть объяснено увеличением доступности воды к ее активным центрам.

Ранее влияние озона на активность изолированной ХЭ в растворе изучалось на образцах, которые не подвергались замораживанию [15]. Было установлено, что максимальное повышение активности ХЭ наблюдается при обработке образца барботированием озono-кислородной смесью в течение 1 мин при концентрации озона 7 мг/л. Эти же условия обработки озоном были применены нами в данной работе и для замороженного-отогретого образца с целью исследования методом флуоресценции совместного влияния низких доз озона и медленного замораживания-отогревания на состояние молекулы ХЭ.

На рис. 2 представлены спектры собственной флуоресценции ХЭ без замораживания-отогревания, после медленного замораживания-отогревания и после добавления озона в замороженный-отогретый образец.

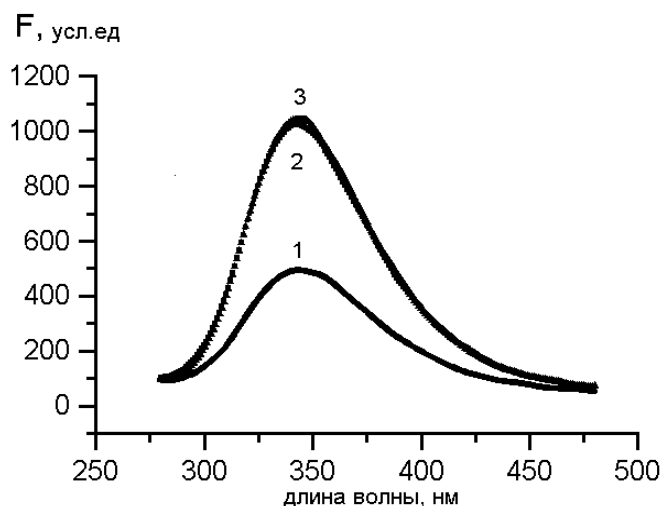


Рис. 2. Спектры собственной флуоресценции холинэстеразы при возбуждении на длине волны 280 нм:
1 – без замораживания (контроль); 2 – после медленного замораживания-отогревания;
3 – после медленного замораживания-отогревания и введения озона.

Из рис. 2 видно, что после замораживания-отогревания обработка озоном не приводит к заметным отличиям в характере флуоресценции ХЭ. Отсюда можно сделать заключение о том, что низкие дозы озона не приводят к дополнительным структурным изменениям макромолекулы на фоне изменений, вызванных медленным замораживанием-отогреванием. Действие низких доз озона, вероятно, подобно действию медленного замораживания-отогревания ХЭ, и связано с конформационными изменениями молекулы фермента на уровне четвертичной структуры.

Полученные результаты позволили сделать предположение о механизме воздействия медленного замораживания-отогревания и низких доз озона на макромолекулу ХЭ. Дальнейшие исследования по теме публикации могут быть связаны с изучением механизмов совместного воздействия низких температур и озона на другие внутриклеточные белки.

ВЫВОДЫ

Озон при оптимальной дозировке может применяться в криобиологических технологиях для снижения уровня криоповреждений холинэстеразы при её медленном замораживании-отогревании.

ЛИТЕРАТУРА

1. Furchgott R.F. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine / R.F. Furchgott, J.V. Zawadzki // *Nature*. – 1980. – Vol. 288, № 5789. – P. 373 – 376.
2. Minetti M. Bilirubin is an effective antioxidant of peroxynitrite-mediated protein oxidation in human blood plasma / M. Minetti, C. Mallozzi, A.M.M. Di. Stasi, D. Pietraforte // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. – 1998. – Vol. 352, № 2. – P. 165–174.
3. Brouard S. Carbon monoxide generated by heme oxygenase 1 suppresses endothelial cell apoptosis / S. Brouard, L.E. Otterbein, J. Anrather et al. // *The Journal of Experimental Medicine*. – 2000. – Vol. 192, № 7. – P. 1015–1026.

4. Pannen B.H.J. Protective role of endogenous carbon monoxide in hepatic microcirculatory dysfunction after hemorrhagic shock in rats / B.H.J. Pannen, N. Köhler, B. Hole et al. // The Journal of Clinical Investigation. – 1998. – Vol. 102, № 6. – P. 1220 – 1228.
5. Wang R. The gasotransmitter role of hydrogen sulfide / R.Wang // Antioxidants and Redox Signaling. – 2003. – Vol. 5, № 4. – P. 493–501.
6. Bocci V. Is it true that ozone is always toxic? The end of a dogma / V.Bocci // Toxicology and Applied Pharmacology. – 2006. – Vol. 216, № 3. – P. 493 – 504.
7. Wentworth Jr P. Evidence for ozone formation in human atherosclerotic arteries / Jr P. Wentworth, J. Nieva, C. Takeuchi et al. // Science. – 2003. – Vol. 302, № 5647. – P. 1053–1056.
8. Bocci V.A. Scientific and medical aspects of ozone therapy. State of the art / V.A. Bocci // Archives of Medical Research. – 2006. – Vol. 37, № 4. – P. 425 – 435.
9. Bette M. Efficiency of tazobactam/piperacillin in lethal peritonitis is enhanced after preconditioning of rats with O₃/O₂-pneumoperitoneum / M. Bette, R.M. Nusing, R. Mutters et al. // Shock. – 2006. – Vol. 25, № 1. – P. 23 – 29.
10. Paolo N. Di et al. Necrotizing fasciitis successfully treated with extracorporeal blood oxygenation and ozonation (EBOO) / N. Di Paolo, V. Bocci, F. Cappelletti et al. // International Journal of Artificial Organs. – 2002. – Vol. 25, № 12. – P. 1194–1198.
11. Масленников О.В. Озонотерапия. Внутренние болезни / О.В. Масленников, К.Н. Конторщикова – Н. Новгород: «Вектор – ТиС», 2003, – 132 с.
12. Конторщикова К.Н. Регуляторные эффекты озона / К.Н. Конторщикова // Нижегородский медицинский журнал. – Прилож. Озонотерапия. – 2003. – С. 5 – 6.
13. Мельникова А.М. Разнонаправленное действие низких и высоких доз озона на репродуктивную способность и активность дыхания дрожжевых клеток *C. utilis* / А.М. Мельникова, Г.В. Калер, Г.В. Бабич и др. // Журнал общей биологии. – 1989. – Т. 50, № 6. – 815 – 818.
14. Радаева М.В. Состояние антиоксидантной и детоксицирующих систем при коррекции метаболических нарушений малыми дозами озона / М.В. Радаева, М.В. Ведунова, К.Н. Конторщикова // Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского – 2008. – № 2. – с. 100 – 102.
15. Белих І.А. Дія озону на біополімери та озонові методи в кріобіології. Автореф. дис. ... канд. біол. наук. – Х., 2005. – 21с.
16. Fuller B.J. Life in the frozen state / B.J.Fuller, E.E. Benson, N. Zane – N.Y.: CRS Press. 2004. – 672 p.
17. Гаврик В.А. Влияние режимов замораживания на взаимодействие фибриногена с флуоресцентным зондом ДСМ / В.А. Гаврик, Э.А. Ромоданова, Т.С. Дюбко, С.В. Гаташ // Біофізичний вісник. – 1999. – Вып. 5(3). – С. 41 – 43.
18. Луговой В.И. Влияние низких температур на растворимые ферменты / В.И. Луговой // Итоги науки и техники. – ВИНТИ. Сер. Биофизика. – 1978. – Т. 9. – С. 53 – 79.
19. Блажеевський М.Є. Нова аналітична система оцінки каталітичної активності холінестераз / М.Є. Блажеевський // Фармація ХХІ століття: Тез. доп. Всеукр. наук. –практ. конф., 23 – 24 жовтня, 2002, М. Харків, – Х., 2002. – С. 99 – 100.
20. Грищенко В. И. К определению скорости охлаждения биологических объектов в цилиндрических контейнерах / В. И. Грищенко, А. В. Дунаевская // Проблемы криобиологии. – 2002. – № 1. – С. 7 – 13.
21. Бабенко В. И. О высоких скоростях замораживания и охлаждения биологических объектов в цилиндрических контейнерах при их погружении в жидкий азот / В. И. Бабенко, В. И. Грищенко, А. В. Дунаевская // Проблемы криобиологии. – 2005. – 15, № 2. – С. 129 – 136.
22. Сакун О. В. Вплив розмірів контейнера на результат кріоконсервування суспензії *Saccharomyces cerevisiae* / О. В. Сакун, І. П. Висеканцев, А. Ю. Сіренко, Є. О. Гордієнко // Проблемы криобиологии. – 2008. – Т. 18, № 2. – С. 221.
23. Бурштейн Э.А. Тушение флуоресценции белков / Э.А. Бурштейн // Биофизика. – 1968. – Т.13, № 3. – С. 483.
24. Демченко А.П. Ультрафиолетовая спектрофотометрия и структура белков / А.П. Демченко – Киев: Наук. думка, 1981. – 208 с.

25. Грек А.М. Вплив кріопротекторів на спектри флуоресценції альбуміну сироватки крові бика / А.М. Грек, В.И. Луговой, А.М. Белоус // Український біохімічний журнал. – 1974. – Т. 46, № 1. – С. 62 – 68.
26. Демченко А.П. Люминесценция и динамика структуры белков / А.П. Демченко – Киев: наук. думка, 1988. – 277 с.
27. Hellman K. The effect of freeze-drying on the quaternary structure of L-asparaginase from *Erwinia carotovora* / K. Hellman, D. S. Miller, K. A. Cammack // BIOCHIM BIOPHYS ACTA – 1983. – Vol. 12, № 749(2). – P. 133 – 42.

УДК 612.13-053.81:577.152

РОЛЬ ОКСИДУ АЗОТУ В ЗАБЕЗПЕЧЕННІ АДАПТИВНИХ МОЖЛИВОСТЕЙ СИСТЕМИ КРОВООБІГУ ПРАКТИЧНО ЗДОРОВИХ ЮНАКІВ І ДІВЧАТ 18-20 РОКІВ

Богдановська Н.В., к.б.н., доцент

Запорізький національний університет

Робота присвячена вивченню ролі системи синтезу оксиду азоту в забезпеченні адаптивних можливостей серцево-судинної системи практично здорових хлопців і дівчат у віці 18-20 років (57 осіб). Встановлено, що, незалежно від статі, зниження адаптивних можливостей у цих осіб супроводжується зниженням активності конститутивної і сумарної NOS, аргінази, нітратредуктази, зростанням активності індукційної NO-синтази, збільшенням її частки в загальному пулі NO-синтаз і вираженим зниженням вазодилатаційної реакції плечової артерії на штучно створену гіперемію. Показано, що основний внесок у загальний синтез NO в організмі осіб із високим рівнем адаптивних можливостей серцево-судинної системи вносить окислювальний кальційзалежний шлях утворення оксиду азоту за участю cNOS.

Ключові слова: оксид азоту, адаптивні можливості, серцево-судинна система, структурно-функціональна організація серця, функціональний взаємозв'язок, юнаки і дівчата, 18-20 років.

Богдановская Н.В. РОЛЬ ОКСИДА АЗОТА В ОБЕСПЕЧЕНИИ АДАПТИВНЫХ ВОЗМОЖНОСТЕЙ СИСТЕМЫ КРОВООБРАЩЕНИЯ ПРАКТИЧЕСКИ ЗДОРОВЫХ ЮНОШЕЙ И ДЕВУШЕК 18-20 ЛЕТ / Запорожский национальный университет, Украина.

Работа посвящена изучению роли системы синтеза оксида азота в обеспечении адаптивных возможностей сердечно-сосудистой системы практически здоровых юношей и девушек в возрасте 18-20 лет (57 человек). Установлено, что независимо от пола, снижение адаптивных возможностей у этих лиц сопровождается снижением активности конститутивной и суммарной NOS, аргиназы, нитратредуктазы, ростом активности индуцибельной NO-синтазы, увеличением ее доли в общем пуле NO-синтазы и выраженным снижением вазодилатационной реакции плечевой артерии на искусственно созданную гиперемию. Показано, что основной вклад в общий синтез NO в организме лиц с высоким уровнем адаптивных возможностей сердечно-сосудистой системы вносит окислительный кальцийзависимый путь образования оксида азота при участии cNOS.

Ключевые слова: оксид азота, адаптивные возможности, сердечно-сосудистая система, структурно-функциональная организация сердца, функциональная взаимосвязь, юноши и девушки, 18-20 лет.

Bogdanovskaya N.V. ROLE OF NITRIC OXIDE IN ENSURING ADAPTIVE ABILITIES OF THE CARDIOVASCULAR SYSTEM OF PRACTICALLY HEALTHY YOUTH AND GIRLS 18-20 YEARS OLD / Zaporizhzhya national university, Ukraine.

This paper studies the role of nitric oxide synthesis system in ensuring the adaptive capacity of the cardiovascular system of practically healthy youth and girls aged 18-20 years (57 persons). Regardless of sex, reducing the adaptive capacity of these individuals is accompanied by decreased activity of the constitutive and total NOS, arginase, nitrate reductase, increased activity of inducible NO-synthase, increased its share in the total pool of NO-synthase and a pronounced decrease in vasodilation reaction of brachial artery at an artificially created congestion is founded. The main contribution to the total synthesis of NO in the body of persons with high levels of adaptive capacity of the cardiovascular system makes the oxidation calcium dependent pathway of nitric oxide synthesis with the participation of cNOS is shown.

Key words: nitric oxide, adaptive capacity, cardio-vascular system, the structural and functional organization of the heart, the functional relationship, youth and girls, 18-20 years.